7月 July
2020, 63(7): 835–842

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.07.007

孢悬液浓度和宿主体型大小对球孢白僵菌对松墨天牛幼虫的致病力的影响

郭 涵[1,2], 刘柱东[1], 孙江华[1,3,*]

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;
2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院生物互作卓越创新中心, 北京 100049)

摘要:【目的】球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是一种被广泛用于害虫生物防治的生防菌。本研究探讨了孢悬液浓度和宿主体型大小对球孢白僵菌对松墨天牛 *Monochamus alternatus* 幼虫的致病力的影响,旨在为松墨天牛的生物防治提供科学基础。【方法】分别用0.5% 吐温-80(CK)以及 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 的球孢白僵菌孢悬液接种松墨天牛 4 龄幼虫,统计接种后 15 d 内幼虫死亡率和染菌率。同时用最佳浓度(1×10^9 孢子/mL)的球孢白僵菌孢悬液接种体型大小分别为 100~150, 200~220, 300~320, 400~420, 500~520 和 600~650 mg/头的松墨天牛幼虫,测定接种后 20 d 内幼虫的死亡率和染菌率。【结果】接种 1×10^5~1×10^9 孢子/mL 的球孢白僵菌后,松墨天牛 4 龄幼虫起初活动自如,后在头部出现烧灼状伤并且体色逐渐变红,最后周身长满菌丝。不同浓度下,随球孢白僵菌孢子浓度升高,松墨天牛 4 龄幼虫校正死亡率和校正染菌率增加。接种 1×10^6~1×10^9 孢子/mL 球孢白僵菌孢悬液 15 d 的松墨天牛 4 龄幼虫累计校正死亡率均可达到 100%, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 浓度下,松墨天牛达到 100% 校正死亡率所需时间最少。接种 0 (CK), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 球孢白僵菌孢悬液的松墨天牛 4 龄幼虫校正染菌率在第 15 天分别为 0, 20.00%, 86.67%, 90.00%, 96.67% 和 100.00%,表现为白僵菌孢子浓度越高,染菌率越高。1×10^9 孢子/mL 的接种浓度下,松墨天牛幼虫个体越大,天牛幼虫死亡率和染菌率越高。表现在第 20 天时,体型大小为 100~150, 200~220, 300~320, 400~420, 500~520 和 600~650 mg/头的幼虫的死亡率分别为 76.67%, 76.67%, 66.67%, 93.33%, 100.00% 和 100.00%,染菌率分别为 60.00%, 63.33%, 60.00%, 86.67%, 96.67% 和 100.00%。【结论】球孢白僵菌悬浮液浓度对松墨天牛幼虫的死亡和侵染有显著影响,表现为随孢子浓度的增加而增加;同时,松墨天牛幼虫个体越大,死亡率和染菌率越高。研究结果对开展利用球孢白僵菌防治松墨天牛具重要借鉴和指导意义。

关键词: 球孢白僵菌; 松墨天牛; 孢悬液; 体型大小; 致病力; 染菌率; 生物防治

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)07-0835-08

Effects of spore suspension concentration and host body size on the pathogenicity of *Beauveria bassiana* against *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae

GUO Han[1,2], LIU Zhu-Dong[1], SUN Jiang-Hua[1,3,*] (1. State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. CAS Center for Excellence in

基金项目:"十三五"国家重点研发计划"基于群落和景观的林业生物灾害生态调控技术"(2018YFD0600204)
作者简介: 郭涵, 女, 1995 年生, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态, E-mail: guohan@ioz.ac.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: sunjh@ioz.ac.cn
收稿日期 Received: 2019-12-24; 接受日期 Accepted: 2020-02-18

Biotic Interactions, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract:【Aim】*Beauveria bassiana* is widely used in the biological control of insect pests. This study aims to investigate the effects of spore suspension concentration and host body size on the pathogenicity of *B. bassiana* against the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, so as to provide basic information for practical biological control of *M. alternatus* using fungi *B. bassiana*.【Methods】After the 4th instar larvae of *M. alternatus* were inoculated with 0.5% Tween-80 (CK) and different concentrations (1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 and 1×10^9 conidia/mL) of *B. bassiana* spore suspension, respectively, the larval mortality and infection rate within 15 d post inoculation were assayed. Furthermore, after *M. alternatus* larvae in different body size (100 - 150, 200 - 220, 300 - 320, 400 - 420, 500 - 520 and 600 - 650 mg/individual) were inoculated with the optimal concentration (1×10^9 conidia/mL) of *B. bassiana* spore suspension, the larval mortality and infection rate within 20 d post inoculation were determined.【Results】After inoculation with 1×10^5 - 1×10^9 conidia/mL *B. bassiana* spore suspension, the 4th instar larvae of *M. alternatus* moved freely at the beginning, then they showed burned symptom on the head and their body color gradually turned red. Finally, the whole body was covered with hyphae. With the increase of spore concentration of *B. bassiana*, the corrected mortality and infection rate of the larvae increased significantly. When the 4th instar larvae were exposed to 1×10^6 - 1×10^9 conidia/mL *B. bassiana* spore suspension for 15 d, their accumulative corrected mortality rates in various treatments reached 100%. After the 4th instar larvae were inoculated with *B. bassiana* spore suspension at the concentrations of 1×10^7, 1×10^8 and 1×10^9 conidia/mL, the duration before death was the shortest. Similarly, at 15 d post inoculation, the corrected infection rates of the 4th instar larvae exposed to 0 (CK), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 and 1×10^9 conidia/mL *B. bassiana* spore suspension were 0, 20.00%, 86.67%, 90.00%, 96.67% and 100.00%, respectively, showing that the higher concentration of *B. bassiana* spore suspension, the higher infection rate of *M. alternatus* larvae. Furthermore, the test results of the effects of 1×10^9 conidia/mL *B. bassiana* spore suspension on *M. alternatus* larvae in different body size showed that the larger the larvae, the higher their mortality and infection rate. At 20 d post inoculation with 1×10^9 conidia/mL *B. bassiana* spore suspension, the mortality rates of *M. alternatus* larvae with the body size of 100 - 150, 200 - 220, 300 - 320, 400 - 420, 500 - 520 and 600 - 650 mg/individual were 76.67%, 76.67%, 66.67%, 93.33%, 100.00% and 100.00%, respectively, and the infection rates were 60.00%, 63.33%, 60.00%, 86.67%, 96.67% and 100.00%, respectively.【Conclusion】The concentration of *B. bassiana* spore suspension has significant effects on the mortality and infection rate of *M. alternatus* larvae, both of which increase with the increasing of spore concentration. Furthermore, the larger the larvae of *M. alternatus*, the higher their mortality and infection rate by *B. bassiana*. Our results provide new clues for the management of *M. alternatus* by using *B. bassiana*.

Key words: *Beauveria bassiana*; *Monochamus alternatus*; spore suspension; body size; pathogenicity; bacterial infection rate; biological control

松墨天牛 *Monochamus alternatus*，别称松褐天牛，是重大森林植物检疫性病害——松萎蔫病致病因子松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的主要媒介昆虫(Mamiya and Enda, 1972; Linit *et al.*, 1983; Togashi, 1989)。该昆虫在国内分布于河北以南，西藏以东；南至广东，东至台湾；国外分布于日本、朝鲜、老挝、越南等国(杨宝君等, 2003)。其寄主有马尾松、湿地松、卡锡松、黑松、云南松、火炬松等，也可危害雪松、冷杉、云杉和落叶松(赵锦年和应杰, 1989; 周冰颖, 2018)。该天牛幼虫蛀食树干和枝条的韧皮部及木质部，破坏组织，影响水分、养分运输，严重危害松树。松材线虫，原产于北美地区，由松墨天牛携带传播扩散，后传播到日本、中国、韩国、墨西哥和葡萄牙等地，造成松树大量枯萎死亡

(Linit, 1989)。我国于 1982 年在南京中山陵的黑松上首次发现松材线虫(杨宝君等, 2003),30 年来蔓延扩散至 18 个省 588 个县级行政区,最西抵达四川省凉山州,最北端在辽宁北部多个县区,并已入侵多个国家级风景名胜区,累计发生面积约 6.5 万公顷(http://www.forestry.gov.cn/main/3457/20190424/162731641935736.html)。松材线虫不能自行传播,必须借助媒介昆虫天牛进行传播扩散(Linit, 1988),因此,防治媒介昆虫松墨天牛,是防控松材线虫传播扩散的有效途径。

对松材线虫病的治理主要是通过直接防治松材线虫和间接防治松墨天牛(Kobayashi *et al*., 1984; 展茂魁等, 2014)。目前采取的化学防治措施主要包括通过人工单株注干施药方式杀灭松材线虫和通过飞机空中施药和地面机械喷药杀灭松墨天牛(刘洪剑等, 2007)。化学药剂会对环境产生污染,同时也会杀死大量昆虫天敌,并且林间施用不便,防治效果差,生物防治松墨天牛成为研究重点,除利用信息素进行大规模诱杀外,还可以利用昆虫天敌和病原真菌。如利用寄生天敌川硬皮肿腿蜂 *Scleroderma sichuanensis*、花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* 和病原微生物白僵菌等防治天牛(崔永三, 2011; 杨远亮等, 2013)。

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是自然界广泛存在的子囊菌类虫生真菌(Quesada *et al*., 2014)。白僵菌可寄生鳞翅目、鞘翅目、同翅目、膜翅目等 700 多种昆虫,也因为其有广泛的寄主范围、较强的致病性和适应性等特点,成为了农林业害虫生物防治的最广泛使用的虫生真菌之一(季香云和杨长举, 2003; 高红等, 2011)。致病机制是白僵菌通过孢子接触到虫体,产生芽管进入虫体,其代谢物质扰乱昆虫的角质层、细胞膜以及细胞核等细胞器的运作,导致昆虫因代谢紊乱而死亡(Gupta *et al*., 1994; Duan *et al*., 2017)。白僵菌是日本应用最广泛的真菌,自 1991 年日本日东电工发明了昆虫病原真菌的无纺布载体培养技术,日本便开始生产白僵菌无纺布条以应用于松墨天牛等生物的防治(王滨等, 2003)。我国也针对白僵菌防治松墨天牛展开了一系列研究。例如,孙继美等(1997)和胡加付等(2006)先后筛选出对松墨天牛致病力高的菌株并应用于生产实践;刘洪剑等(2007, 2009)尝试用媒介昆虫如管氏肿腿蜂 *Scleroderma guan* 携带和添加增效剂等方法提高白僵菌对松墨天牛感染率,取得了一定的效果。目前对于利用白僵菌防治松墨天牛的研究内容主要包括优良菌株的筛选、侵染途径的优化、感染机制和应用(孙继美等, 1997; 胡加付等, 2006; 刘洪剑, 2007, 2009; 詹伟军, 2013; 阳飞等, 2014)。对于松墨天牛本身,如虫体大小,在利用白僵菌防治松墨天牛中产生的影响研究较少。本文探讨了不同浓度的白僵菌对松墨天牛的致病能力和松墨天牛幼虫虫体的大小对施菌作用的影响,旨在为利用白僵菌防治松墨天牛提供应用。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫和真菌

松墨天牛幼虫于 2018 年 11 月采自浙江富阳昌东村。每头天牛编号、称重和测量头壳宽后置于 10 mL 的塑料离心管单管饲养,喂食马尾松锯末粉为主的半人工饲料(马尾松锯木粉 200 g,琼脂粉 20 g,山梨酸 1 g,对羟基苯甲酸 2 g,抗坏血酸 2 g,亚油酸 12 滴,水 650 mL),放置在 4 ℃冰箱中长期保存备用,期间每 3 个月更换一次人工饲料。

球孢白僵菌为商用球孢白僵菌孢子粉(BotaniGard 22WP),由中国科学院动物研究所邹振研究组提供。

1.2　球孢白僵菌对松墨天牛幼虫的致病力试验

1.2.1　孢悬液浓度对球孢白僵菌致病力的影响:参照柳建定等(2012)和郭雅琦等(2015)的研究,将松墨天牛幼虫分为 5 龄,其中 4 龄幼虫头壳宽范围为 2.2 ~ 3.0 mm,5 龄幼虫头壳宽范围为 3.0 ~ 4.5 mm。根据龄期与头壳宽的关系,选择头壳宽范围为 2.2 ~ 3.0 mm 的的幼虫,即 4 龄幼虫用于本试验。

本试验探究不同浓度的白僵菌孢悬液对松墨天牛幼虫适合度的影响,试验设置了 6 个处理: 0(CK), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 浓度,其中对照(CK)为含 0.5% 吐温-80 的无菌水。参照雷妍圆等(2010)的浸虫法,用含 0.5% 吐温-80 的无菌水将白僵菌孢子粉配制成浓度为 0(CK), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 的孢子悬浮液,用镊子将供试幼虫挑入菌液,浸渍 10 s 后挑出,幼虫置于吸水纸上吸去多余水分,每 10 头幼虫为 1 个重复,各处理重复 3 次。

松墨天牛 4 龄幼虫在用孢悬液处理后,与对照组一同置于 25℃恒温培养箱内培养,逐日观察并记录天牛幼虫发病过程、死亡情况及白僵菌感染情况,统计校正死亡率和校正染菌率。当虫体颜色变深红后会逐渐僵硬,此时晃动养虫管而虫体不动时,即判

定为死亡。在死亡后，虫体保湿培养，观察菌丝生长及产孢情况，挑片镜检并根据 Dangi 和 Lim(2018)的描述方法提取虫体体表菌丝体进行分子鉴定以确认是否为白僵菌感染致死。

1.2.2 宿主体型大小对白僵菌致病力的影响：研究一定浓度白僵菌对不同体型大小的松墨天牛幼虫的致病力。选用最佳感染浓度 1×10^9 孢子/mL，试验设置 6 个处理，测定松墨天牛幼虫的死亡率和染菌率。试验幼虫按大小分为 100 ~ 150, 200 ~ 220, 300 ~ 320, 400 ~ 420, 500 ~ 520 和 600 ~ 650 mg/头 6 组，每组随机挑选 30 头(3 个重复，每个重复 10 头幼虫)相应大小的天牛幼虫，用 1×10^9 孢子/mL 浓度白僵菌孢悬液处理。松墨天牛幼虫在用孢悬液处理后，每天观察并记录天牛幼虫颜色变化、死亡情况及白僵菌感染情况，统计死亡率和染菌率。

1.3 数据分析

根据试验观察，运用 Excel 记录整理数据，数据分析采用统计软件 SPSS 20.0。百分数数据在分析前进行了反正弦转换，然后利用 K-S 方法检验数据是否符合正态分布；如果数据符合正态分布，采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析，运用 Duncan 氏多重比较不同浓度的球孢白僵菌孢悬液处理后松墨天牛幼虫的校正死亡率和染菌率的差异显著性以及同一浓度球孢白僵菌孢悬液处理后不同大小虫体松墨天牛幼虫的死亡率和染菌率的差异显著性；如果数据不符合正态分布或方差非齐性，采用非参数分析，用 Kruskal-Wallis *H* 方法进行检验。

2 结果

2.1 接种球孢白僵菌后松墨天牛 4 龄幼虫的染菌发病过程

每天观察发现，接种 1×10^5 ~ 1×10^9 孢子/mL 球孢白僵菌孢悬液后的松墨天牛幼虫起初正常扭动，充满活力；随后接菌天牛通常会行动缓慢，且表皮出现烧灼状伤口；最后幼虫死亡，虫体长菌。虫体长菌一般先从头部开始，逐渐蔓延全身，最后口部也会蔓延出菌丝(图 1)。经高浓度菌液(1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL)处理的幼虫在染菌后出现的感染现象更为明显和快速，且通过分子鉴定确定为白僵菌感染[Length: 571; Expect: 0.0; Identities: 545/545(100%); Gaps: 0/545 (0%)]。


1 d

2 d

3 d

4 d

5 d

6 d

图 1 接种 1×10^9 孢子/mL 球孢白僵菌孢悬液不同时间后松墨天牛 4 龄幼虫的感染症状

Fig. 1 Symptoms of the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus* infected by 1×10^9 conidia/mL *Beauveria bassiana* spore suspension for different days

2.2 不同浓度的球孢白僵菌孢悬液对松墨天牛 4 龄幼虫的致病力

2.2.1 孢悬液浓度对幼虫死亡率的影响：各浓度的白僵菌孢悬液都可以成功侵染松墨天牛 4 龄幼虫，但是不同浓度间存在差异，表现为浓度越大，天牛幼虫死亡率越高(图 2: A)。天牛幼虫第 2 天开始死亡，第 6 天为死亡高峰期。第 1 天接种 0(CK), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 孢悬液的天牛幼虫的累计校正死亡率分别为 0, 0, 0, 6.67%, 3.33% 和 10.00%，差异不显著(H_4 = 5.721, P = 0.221)。从第 2 天开始，天牛幼虫累计校正死亡率出现显著性差异，表现为孢子浓度越高，天牛幼虫死亡率越高(图 2: A)。接菌第 7 天，接种 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 孢悬液的天牛幼虫的累计校正死亡率都达 100.00%，而接种 1×10^5 孢子/mL 孢悬液的天牛幼虫的累计校正死亡率仅为 21.43%(H_4 = 13.745, P < 0.01)。试验结束时(15 d), 0(CK), 1×10^5, 1×10^6, 1×10^7, 1×10^8 和 1×10^9 孢子/mL 各处理组累计校正死亡率分别为 10.00%, 53.33%, 100.00%, 100.00%, 100.00% 和 100.00%(H_4 = 13.796, P < 0.01)。

2.2.2 孢悬液浓度对幼虫染菌率的影响：接种不同浓度的球孢白僵菌后，松墨天牛 4 龄幼虫的染菌状况与染菌浓度和染菌时间有着密切的关系，浓度越

大，幼虫累计校正染菌率越高（图 2：B）。经处理的天牛幼虫从第 2 天开始长菌丝，从第 4 天开始累计校正染菌率开始出现显著性变化，1×10^5 孢子/mL 处理中天牛幼虫累计校正染菌率最低（图 2：B）。试验结束时（第 15 天），$1\times10^6\sim1\times10^9$ 孢子/mL 组中幼虫累计校正染菌率都在 85.00% 以上，而最低浓度（1×10^5 孢子/mL）处理下幼虫累计校正染菌率为 20.00%，与对照（染菌率为 0）间差异显著（$F_{4,10}=15.306$，$P<0.01$）。

2.3　松墨天牛幼虫体型大小对球孢白僵菌孢悬液致病力的影响

2.3.1　体型大小对幼虫死亡率的影响：总体上看，在浓度为 1×10^9 孢子/mL 的球孢白僵菌孢悬液的处理下，不同体型大小的松墨天牛幼虫的死亡率随体重的升高而明显增加（图 3：A）。经球孢白僵菌处理的天牛幼虫第 2 天开始死亡，第 2－10 天期间，不

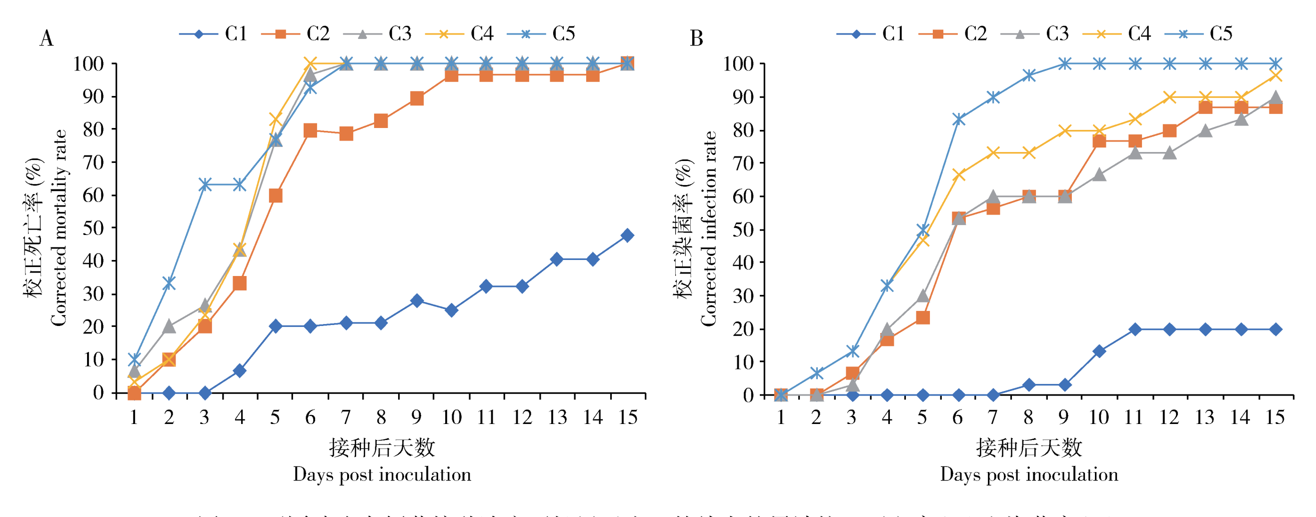


图 2　不同球孢白僵菌接种浓度下松墨天牛 4 龄幼虫的累计校正死亡率（A）和染菌率（B）

Fig. 2　Accumulative corrected mortality rate (A) and infection rate (B) of the 4th instar larvae of *Monochamus alternatus* inoculated with different concentrations of *Beauveria bassiana*

C1：1.0×10^5 孢子/mL 1.0×10^5 Conidia/mL；C2：1.0×10^6 孢子/mL 1.0×10^6 Conidia/mL；C3：1.0×10^7 孢子/mL 1.0×10^7 Conidia/mL；C4：1.0×10^8 孢子/mL 1.0×10^8 Conidia/mL；C5：1.0×10^9 孢子/mL 1.0×10^9 Conidia/mL. 统计检验采用单因素方差分析（ANOVA）和 Kruskal-Wallis *H* 检验 Statistical tests used one-way analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis *H* test.

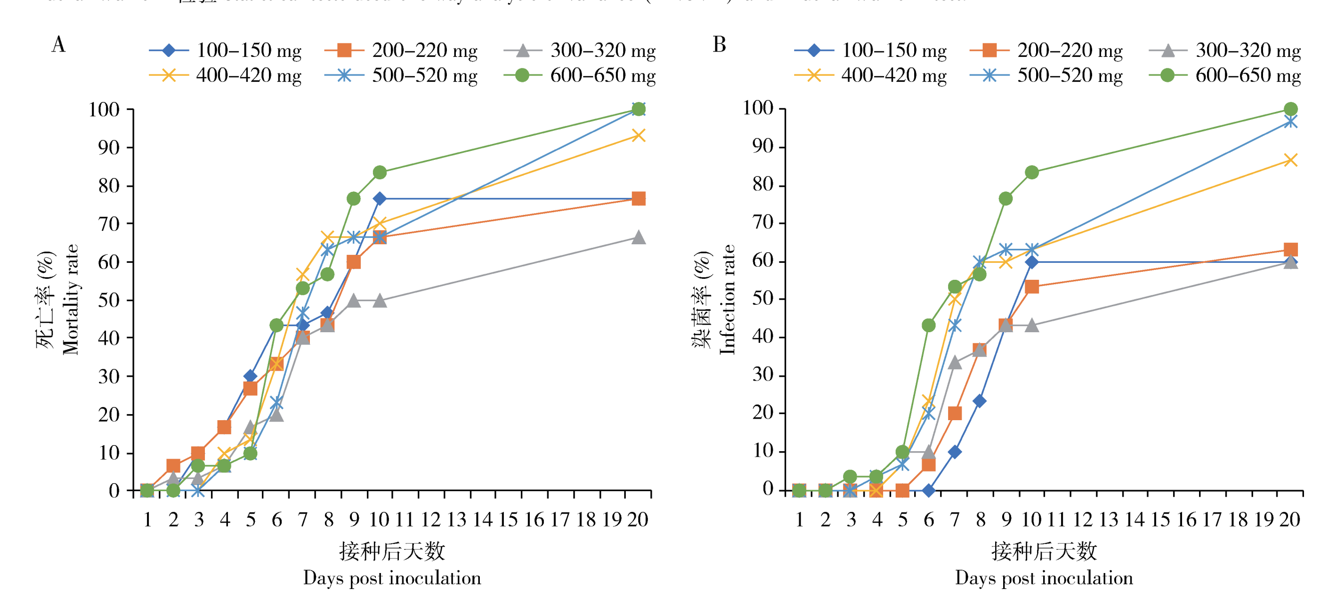


图 3　接种 1×10^9 孢子/mL 球孢白僵菌后不同体型大小的松墨天牛幼虫的累计死亡率（A）和染菌率（B）

Fig. 3　Accumulative mortality rate (A) and infection rate (B) of *Monochamus alternatus* with different body size after inoculation with 1×10^9 conidia/mL of *Beauveria bassiana*

统计检验采用单因素方差分析（ANOVA）和 Kruskal-Wallis *H* 检验。Statistical tests used one-way analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis *H* test.

同体型大小的天牛幼虫死亡率无显著差异($P>0.05$);第 20 天时,体重较低的天牛幼虫(100 ~ 320 mg/头)死亡率较低,体重较高的天牛幼虫(400 ~ 650 mg/头)死亡率较高,两者差异显著($H_5=12.860$, $P=0.025$)(图 3: A)。

2.3.2 体型大小对幼虫染菌率的影响:在浓度为 1×10^9 孢子/mL 的球孢白僵菌孢悬液的处理下,不同体型大小的松墨天牛幼虫的染菌率随体重的升高而明显增加(图 3: B)。在长菌的过程中,体型大的天牛幼虫相较于体型小的出现了更高的染菌率。天牛幼虫第 3 天体表开始出现菌丝,第 6 – 20 天,不同处理的天牛染菌率出现显著差异,表现为大个体天牛幼虫的染菌率显著比小个体天牛幼虫高($P<0.05$)(图 3: B)。试验结束(第 20 天)时,体型大小分别为 100 ~ 150, 200 ~ 220, 300 ~ 320, 400 ~ 420, 500 ~ 520 和 600 ~ 650 mg/头的天牛幼虫染菌率分别为 60.00%, 63.33%, 60.00%, 86.67%, 96.67% 和 100.00% ($F_{5,12}=8.521$, $P<0.01$)。

3 讨论

本研究结果表明,球孢白僵菌孢悬液对松墨天牛幼虫具有良好活性,其效果与孢悬液的浓度和天牛幼虫的大小有关。通过对比不同浓度的孢悬液处理后松墨天牛 4 龄幼虫的死亡率和染菌率发现,接种较高浓度孢悬液对松墨天牛幼虫的致病力较强。浓度为 1×10^9 孢子/mL 时对天牛幼虫的感染力最高,发病最快,表现为第 3 – 5 天出现死亡高峰,在第 5 – 6天出现虫体长菌丝的高峰期(图 2)。同时,在相同浓度(1×10^9 孢子/mL)的球孢白僵菌孢悬液处理下,个体较大的松墨天牛幼虫的发病率显著高于个体较小的幼虫,在感染率上明显上升,约为其两倍(图 3)。这些研究结果将为松墨天牛的治理提供思考。

许多研究表明,球孢白僵菌在森林病虫害防治中发挥着不可替代的作用。日本自 20 世纪 90 年代便开始生产白僵菌用于生物防治(王滨等, 2003),我国也在其后筛选出松墨天牛高致病力菌株并应用在生产实践中(孙继美等, 1997)。然而,在实际应用中,白僵菌的防治效果受多方面因素的影响,如紫外线、雨水、温度、湿度、区域和天牛本身的钻蛀危害习性(Walstead *et al.*, 1970),使得孢子较难进入树木坑道、侵染天牛幼虫。借助天敌昆虫携带白僵菌孢子,如管氏肿腿蜂,将白僵菌传入隐蔽性危害的松墨天牛幼虫的坑道内,进而侵染天牛,并且已有报道证实白僵菌和天敌联合施用的防治效果高于单一方法的防治效果(王功桂等, 2004; 刘洪剑等, 2007)。根据白僵菌浓度越高,天牛幼虫发病越快、染菌率越高的特点,在利用白僵菌防治松墨天牛的过程中,对松墨天牛发生重灾区,建议选配 1×10^9 孢子/mL 白僵菌快速高效地侵染松墨天牛幼虫,快速降低松墨天牛虫口密度,减轻天牛幼虫对松树韧皮的危害,保护松树的同时阻断松材线虫的传播。而对松墨天牛的一般发生区(松墨天牛的危害对松树不致死情况下),可选配 1×10^7 孢子/mL 白僵菌,持续侵染松墨天牛,将松墨天牛的虫口密度控制在经济阈值以下。此外,发病进度表明松墨天牛一旦染菌,通常在 10 d 内死亡,为林间白僵菌施用的频次提供指导。由于松墨天牛世代重叠,幼虫发育不整齐,每年的 5 – 10 月林间均有不同大小幼虫(郭雅琦等, 2015),建议利用白僵菌进行生物防治时,白僵菌的使用频次以半月为宜。

在使用球孢白僵菌防治松墨天牛中,除了考虑施菌的浓度和时间,还需考虑天牛体型的大小。本试验发现,松墨天牛幼虫的体型大小也影响球孢白僵菌的侵染效果,表现为个体大的天牛染菌率更高(图 3)。通常认为试虫个体越大,对病菌的抗性越强,越不容易感病(詹伟君等, 2013)。试验过程中观察发现,天牛幼虫在接种球孢白僵菌后,虫体扭动加剧,推测大个体天牛幼虫染菌率高的原因可能是天牛幼虫越大,扭动越不灵活,不能及时除去沾在体表的孢子,从而更容易被球孢白僵菌侵染。利用白僵菌对不同大小天牛的侵染差异特点,采用管氏肿腿蜂与白僵菌协同防治松墨天牛将是更好的策略。二者可以在时间上互补协同控害,肿腿蜂的寄生最佳时期为松墨天牛幼虫的 2 – 3 龄期(王功桂等, 2004),而白僵菌对高龄幼虫更有效;此外,前人研究表明管氏肿腿蜂和白僵菌可联合使用,不产生负影响(de la Rosa *et al.*, 2000; 刘洪剑等, 2007),为共同使用防治松墨天牛提供了依据。

本试验中,用不同浓度球孢白僵菌处理,松墨天牛幼虫在发病时间上会出现差异,呈现出浓度越大发病越早的趋势(图 2);对于不同体重的幼虫,受球孢白僵菌侵染后其发病时间也不同,呈现虫体越大发病越早的趋势(图 3)。本试验中浓度的试验和体型大小的试验是相互独立的试验,但 1×10^9 孢子/mL 孢子浓度在前后试验中表现出了致病力的差异,浓度试验中发病早,而体型大小试验中发病晚(图 2

和 3）。分析原因，我们认为有两点值得商讨：其一，白僵菌的致病力可能存在季节性变化，在两个独立试验处理中，浓度试验在 7 月实施，而个体大小试验在次年 1 月实施，病原微生物致病力的季节性变化可能导致了前后试验结果的差异，如已有报道证实柠条根系中丛枝菌根真菌致病力呈季节性变化（刘永俊等，2009）；其二，白僵菌孢子致病力可能与白僵菌孢子粉保存的温度、保存的时间和方式有关系，随着保存时间加长，孢子的活性下降从而致病力降低（张力泉等，2019）。

参考文献（References）

Cui YS, Liu YP, Song YS, Xu FY, Xu KQ, 2011. Control of *Monochamus alternatus* with natural enemies. *For. Pest Dis.*, 30(4): 31–33. [崔永三，刘云鹏，宋玉双，徐福元，徐克勤，2011. 应用天敌昆虫防治松墨天牛试点试验. 中国森林病虫，30(4): 31–33]

Dangi ND, Lim UT, 2018. Identification and evaluation of a new entomopathogenic fungal strain against *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae) and its two egg parasitoids. *PLoS ONE*, 13(4): e0195848.

de la Rosa W, Segura HR, Barrera JF, Williams T, 2000. Laboratory evaluation of the impact of entomopathogenic fungi on *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethylidae), a parasitoid of the coffee berry borer. *Environ. Entomol.*, 29(1): 126–131.

Duan YL, Wu H, Ma ZY, Yang L, Ma DY, 2017. Scanning electron microscopy and histopathological observations of *Beauveria bassiana* infection of Colorado potato beetle larvae. *Microb. Pathog.*, 111: 435–439.

Gao H, Zhang R, Wan YJ, 2011. Advance of studies on classification of genus *Beauveria*. *Sci. Seric.*, 37(4): 730–736. [高红，张冉，万永继，2011. 白僵菌的分类研究进展. 蚕业科学，37(4): 730–736]

Guo YQ, Xin YC, Tao X, Yu H, Liu ZD, 2015. Flight dynamics, body size variation of the pine sawyer *Monochamus alteratus* (Coleoptera: Cerambycidae) and its underlying reasons. *Acta Entomol. Sin.*, 58(9): 989–996. [郭雅琦，辛玉翠，陶希，鱼欢，刘柱东，2015. 松墨天牛成虫雌雄体型差异及蛹和成虫大小与越冬幼虫体重的关系. 昆虫学报，58(9): 989–996]

Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM, 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 64(1): 13–17.

Hu JF, Miao K, Dong ZH, Han B, Fan MZ, Li ZZ, 2006. Field trial of application of *Beauveria bassiana* against *Monochamus altermatus*. *J. Anhui Agric. Univ.*, 33(3): 332–336. [胡加付，缪凯，董振辉，韩斌，樊美珍，李增智，2006. 利用白僵菌防治松褐天牛的试验研究. 安徽农业大学学报，33(3): 332–336]

Ji XY, Yang CJ, 2003. Infection and application of *Beauveria* spp. *Chin. J. Biol. Control*, 19(2): 82–85. [季香云，杨长举，2003. 白僵菌的致病性与应用. 中国生物防治，19(2): 82–85]

Kobayashi F, Yamane A, Ikeda T, 1984. The Japanese pine sawyer beetle as the vector of pine wilt disease. *Annu. Rev. Entomol.*, 29: 115–135.

Lei YY, Lv LH, He YR, 2010. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* to diamondback moth by using different inoculation methods. *Plant Prot.*, 36(6): 142–146. [雷妍圆，吕利华，何余容，2010. 不同接种方式下球孢白僵菌对小菜蛾的致病力. 植物保护，36(6): 142–146]

Linit MJ, 1988. Nematode-vector relationships in the pine wilt disease system. *J. Nematol.*, 20(2): 227–235.

Linit MJ, 1989. Temporal pattern of pinewood nematode exit from the insect vector *Monochamus carolinensis*. *J. Nematol.*, 21(1): 105–107.

Linit MJ, Kondo E, Smith MT, 1983. Insects associated with the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae), in Missouri. *Environ. Entomol.*, 12(2): 467–470.

Liu H, Piao C, Wang L, Shin S, Chung Y, Shu Q, 2007. Biocontrol of *Monochamus alternatus* by *Beauveria bassiana* and *Scleroderma guani*. *Sci. Silv. Sin.*, 43(5): 64–68. [刘洪剑，朴春根，汪来发，申相澈，郑荣镇，束庆龙，2007. 白僵菌和肿腿蜂对松墨天牛幼虫的作用. 林业科学，43(5): 64–68]

Liu HJ, Shu QL, Wang LF, Piao CG, Fang JM, Dong GP, 2009. Research on the biocontrol of *Monochamus alternatus* larvae by *Beauveria bassiana* with several synergists. *For. Res.*, 22(5): 652–656. [刘洪剑，束庆龙，汪来发，朴春根，方建民，董广平，2009. 白僵菌孢悬液添加增效剂对松墨天牛幼虫的致死作用. 林业科学研究，22(5): 652–656]

Liu JD, Li BW, Wang JY, Zhao BA, Shu JP, 2008. Primary study on methods to determine instars of *Monochamus alternatus* larva. *J. Zhejiang For. Sci. Technol.*, 28(4): 84–86. [柳建定，李百万，王菊英，赵宝安，舒金平，2012. 松褐天牛龄级划分方法初探. 浙江林业科技，28(4): 84–86]

Liu YJ, Zheng H, He L, An LZ, Feng HY, 2009. Seasonal variation and related affecting factors of arbuscular mycorrhizal fungi in *Caragana korshinskii* roots. *Chin. J. Appl. Ecol.*, 20(5): 1085–1091. [刘永俊，郑红，何雷，安黎哲，冯虎元，2009. 柠条根系中丛枝菌根真菌的季节性变化及影响因素. 应用生态学报，20(5): 1085–1091]

Mamiya Y, Enda N, 1972. Transmission of *Bursaphelenchus lignicolus* (Nematoda: Aphelenchoididae) by *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Nematologica*, 18(2): 159–162.

Quesada E, Lopze C, Landa BB, 2014. The hidden habit of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: first demonstration of vertical plant transmission. *PLoS ONE*, 9(2): e89278.

Sun JM, Ding S, Xiao H, Cai CX, 1997. Study on the control of *Monochamus alternatus* with *Beauveria bassiana*. *For. Pest Dis.*, (3): 16–19. [孙继美，丁珊，肖华，蔡臣兴，1997. 球孢白僵菌防治松褐天牛的研究. 森林病虫害通讯，(3): 16–19]

Togashi K, 1989. Factors affecting the number of *Bursaphelenchus*

xylophilus (Nematoda: Aphelenchoididae) carried by newly emerged adults of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 24(4): 379–386.

Walstad JD, Anderson RF, Stambaugh WJ, 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). *J. Invertebr. Pathol.*, 16(2): 221–226.

Wang B, Fan MZ, Li ZZ, 2003. Control forest beetles with Beauveria nonwoven fabric sheet in combination with beetle attractants. *Chin. J. Biol. Control*, 19(2): 91–92. [王滨, 樊美珍, 李增智, 2003. 白僵菌无纺布结合引诱剂防治鞘翅目林业害虫研究初报. 中国生物防治, 19(2): 91–92]

Wang GG, Zhou LH, Wang CX, Ma DJ, Lu B, 2004. Techniques of using *Scleroderma guani* against *Monochamus alternatus*. *For. Pest Dis.*, 23(3): 32–34. [王功桂, 周灵会, 王长旭, 马德君, 卢斌, 2004. 管氏肿腿蜂防治松墨天牛技术. 中国森林病虫, 23(3): 32–34]

Yang BJ, Pan HY, Tang J, Wang YY, Wang LF, 2003. Pine Nematode Disease. China Forestry Publishing House, Beijing. 61–62. [杨宝君, 潘宏阳, 汤坚, 王玉燕, 汪来发, 2003. 松材线虫病. 北京: 中国林业出版社. 61–62]

Yang F, Zhong AJ, Shen Y, Hu LM, Tang YL, 2014. Research progress on biological control of pine longhorn beetle *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) by natural enemy. *Biol. Disaster Sci.*, 37(4): 337–340. [阳飞, 钟安建, 申艳, 胡兰梅, 唐艳龙, 2014. 利用天敌防治松墨天牛研究进展. 生物灾害科学, 37(4): 337–340]

Yang YL, Yang ZQ, Wang XY, Yu JX, Yan XW, 2013. Biological control of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) by releasing eggs and adults of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrideridae). *Sci. Silv. Sin.*, 49(3): 103–109. [杨远亮, 杨忠岐, 王小艺, 喻锦秀, 颜学武, 2013. 应用花绒寄甲防治松褐天牛. 林业科学, 49(3): 103–109]

Zhan MK, Yang ZQ, Wang XY, Lai YX, Zhang YF, 2014. Capacity of transmitting *Bursaphelenchus xylophilus* by the vector *Monochamus alternatus* adults. *Sci. Silv. Sin.*, 50(7): 74–81. [展茂魁, 杨忠岐, 王小艺, 来燕学, 张毅丰, 2014. 松褐天牛成虫松材线虫病的传播能力. 林业科学, 50(7): 74–81]

Zhan WJ, Luo YB, Zhang LB, 2013. Biological and virulence study of highly pathogenic *Beauveria bassiana* on pine sawyer *Monochamus alternatus*. *J. Zhejiang A&F Univ.*, 30(1): 83–89. [詹伟君, 罗优波, 张立斌, 2013. 松墨天牛优良球孢白僵菌菌株生物学及毒力研究. 浙江农林大学学报, 30(1): 83–89]

Zhang LQ, Zhang JH, Zha YP, Xia JP, 2019. Effects of different storage temperatures on the activity of *Beauveria bassiana* spores. *Hubei For. Sci. Technol.*, 48(2): 34–35. [张力泉, 张建华, 查玉平, 夏剑萍, 2019. 不同储存温度对白僵菌孢子活性的影响. 湖北林业科技, 48(2): 34–35]

Zhao JN, Ying J, 1989. A study on relationship between the damage of pine sawyer beetle (*Monochamus alternatus*) and pine dying. *Sci. Silv. Sin.*, 25(5): 432–438. [赵锦年, 应杰, 1989. 松墨天牛取食为害与松树枯死关系的研究. 林业科学, 25(5): 432–438]

Zhou BY, 2018. Biological control of pine wood nematode disease and its vector insect *Monochamus alternatus*. *J. Green Sci. Technol.*, (22): 118–121. [周冰颖, 2018. 松材线虫病及其媒介昆虫松墨天牛的生物防治. 绿色科技, (22): 118–121]

(责任编辑: 赵利辉)